

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

08.12.03

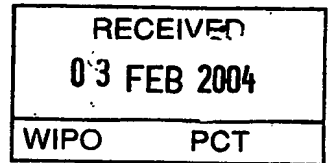
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年12月17日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-365818
[ST. 10/C]: [JP2002-365818]

出 願 人
Applicant(s): アークレイ株式会社

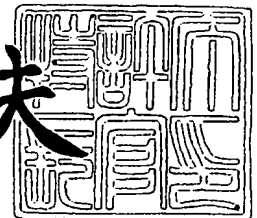


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月16日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 R7402

【提出日】 平成14年12月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ
株式会社内

【氏名】 岡本 雅司

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ
株式会社内

【氏名】 鎌田 達夫

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ
株式会社内

【氏名】 和泉澤 裕司

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ
株式会社内

【氏名】 村上 淳

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6135-6051

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107559

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物の収集方法およびそれに用いる微生物収集用具

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 液状試料から微生物を収集する方法であって、前記液状試料を吸水性樹脂に接触させることにより、前記吸水性樹脂に前記液状試料の液相部を吸収させ、かつ前記吸水性樹脂表面に前記微生物を捕獲して微生物を収集する方法。

【請求項 2】 前記吸水性樹脂に前記液状試料を接触させた後、さらに、前記吸水性樹脂に回収液を接触させることにより、前記吸水性樹脂表面に捕獲された微生物を前記回収液中に回収する請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 フィルターで内部が上下に分けられ、かつ前記フィルター上に吸水性樹脂粒子が配置されている遠心チューブを準備し、この遠心チューブに前記液状試料を入れて前記吸水性樹脂粒子に接触させ、ついで前記回収液を前記遠心チューブに入れて前記吸水性樹脂粒子に接触させ、遠心分離により前記回収液を、前記フィルターを通過させて前記遠心チューブの底部に移動させる請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 前記遠心分離の条件が、500～13000Gで3秒～60分である請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 前記液状試料の添加量が、前記吸水性樹脂の吸水容量以下である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】 前記回収液の添加量が、前記液状試料液の液相部の吸収後における前記吸水性樹脂の吸水可能容量を超えた量である請求項 2 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 前記吸水性樹脂が、親水性官能基を有する親水性架橋重合体である請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 収集の対象となる微生物が、抗酸菌、非定型抗酸菌、淋菌、レジオネラ、マイコプラズマ、スピロヘータ、梅毒スピロヘーター、クラミジア、リケッチア、らい菌、鼠咬症スピリルム、ブドウ球菌、連鎖球菌、大腸菌、緑膿菌、ペスト菌、ウイルス、日本脳炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイ

ルス、ATLV、HIVおよびエボラ出血熱ウイルスからなる群から選択される少なくとも一つである請求項1から7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 前記抗酸菌が、鳥型結核菌 (M. avium)、エム・イントラセルラレエ (M. intracellulareae)、エム・ゴルドネエ (M. gordonae)、ヒト型結核菌 (M. tuberculosis)、エム・カンサシイ (M. kansasii)、エム・フォルツイツム (M. fortuitum)、エム・ケロネエ (M. chelonae)、ウシ型結核菌 (M. bovis)、エム・スクロフラセウム (M. scrofulaceum)、パラ結核菌 (M. paratuberculosis)、チモテ菌 (M. phlei)、エム・マリヌム (M. marinum)、エム・シミエー (M. simiae)、エム・スクロフラセウム (M. scrofulaceum)、エム・スズルガイ (M. szulgai)、らい菌 (M. leprae)、エム・キセノピ (M. xenopi)、エム・ウルセランス (M. ulcerans)、鼠らい菌 (M. lepraemurium)、エム・フラベセンス (M. flavescens)、エム・テレエ (M. terrae)、エム・ノンクロモジェニクム (M. nonchromogenicum)、エム・マルメンズ (M. malmoense)、エム・アジアティクム (M. asiaticum)、エム・ヴァケエ (M. vaccae)、エム・ガストリ (M. gastri)、エム・トリビアル (M. triviale)、エム・ヘモフィラム (M. haemophilum)、エム・アフリカヌム (M. africanum)、エム・サーモレジスタブル (M. thermoresistable) およびスメグマ菌 (M. smegmatis) からなる群から選択される少なくとも一つである請求項8記載の方法。

【請求項10】 前記液状試料が、痰、髄液、糞、唾液、血液、組織、スワブ、胃洗浄液、尿およびこれらの生体試料を前処理した試料からなる群から選択される少なくとも一つである請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 請求項3の方法に使用する微生物収集器具であって、フィルターで内部が上下に分けられ、かつ前記フィルター上に吸水性樹脂粒子が配置されている遠心チューブを含む器具。

【請求項 12】 微生物の遺伝子の特異的に増幅若しくは検出する方法であつて、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法により微生物を収集し、これに非イオン性界面活性剤を含む抽出試薬液を添加して加熱することにより微生物から遺伝子を抽出し、この遺伝子の特異的に増幅もしくは検出する方法。

【請求項 13】 前記抽出試薬液が、前記回収液を兼ねる請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】 前記加熱温度が、70℃以上100℃未満である請求項 12 または 13 記載の方法。

【請求項 15】 前記加熱時間が、1～30分間である請求項 12 から 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】 前記加熱条件が、96℃で10分間の条件である請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 17】 前記抽出試薬液の pH が、pH 7.0～12.0 の範囲である請求項 12 から 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】 前記抽出試薬液中の前記非イオン界面活性剤の濃度が、0.01～10重量%の範囲である請求項 12 から 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】 非イオン界面活性剤が、d-ソルビトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステルおよびポリオキシエチレングリコール p-tert-オクチルフェニルエーテルからなる群から選択される少なくとも一つである請求項 12 から 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】 さらに、前記抽出試薬液が、金属キレート剤を含む請求項 12 から 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】 前記抽出試薬液中の前記金属キレート剤の濃度が、0.1～100mMである請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】 前記金属キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、エチレングリコールビス (β-アミノエチルエーテル) -N, N, N', N'-四酢酸 (EGTA)、ジアミノシクロヘキサン四酢酸、o-フェナンスロリンおよびサリチル酸からなる群から選択された少なくとも一つである請求項 20 または 21 記載の方法。

【請求項 23】 遺伝子の特異的な増幅もしくは検出方法が、ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法である請求項 12 から 22 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、液状試料からの微生物の収集方法およびそれを用いた遺伝子の増幅若しくは検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

結核は、今なお、世界的に重要な細菌性疾患であり、その治療方法のみならず診断方法は極めて重要である。結核の最終的確認は、培養法により行われるが、結核菌の増殖速度は極めて遅いため、培養法の前段階で実施される予備的診断方法の確立が望まれている。このような予備的診断方法として、注目されているのは、ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR 法) を適用した遺伝子検査法である。この方法は、結核菌の遺伝子に特異的なプライマーを用い、結核菌の遺伝子を増幅して検出することにより、結核菌の有無を判定する方法である。

【0003】

前記 PCR 法を適用した予備的診断方法では、その前処理として結核菌を喀痰等の液状試料から菌を集菌する必要がある。従来の集菌方法は、例えば、つぎのようにして実施されていた (非特許文献 1 参照)。まず、N-アセチル-L-システイン (NALC) と水酸化ナトリウム (NaOH) の溶液 (NALC-NaOH 溶液) を加えて粘性を除去した試料液を調製する。この試料液に対し、13000 g で 10 分間の遠心分離をすることにより、菌を沈殿させて集菌する。しかしながら、この従来法での遠心分離による集菌では、その遠心条件が厳しく、煩雑な操作であり、しかも時間もかかり、高価な遠心分離機が必要である。また、この集菌に続く溶菌処理から遺伝子の増幅もしくは検出処理においても、従来の方法には、問題がある。従来の溶菌方法としては、例えば、有機溶媒等を用いた化学的方法、超音波や凍結・融解を繰り返す物理的方法等がある。しかし、結

核菌は、その細胞壁の脂質含量が高く、従来の溶菌法では、遺伝子の抽出を十分に行うことができなかった。また、十分な抽出を行うためには、処理条件を過酷なものにする必要があり、それに伴い、特殊な装置や試薬を使用する必要がある、これに加え、処理時間の長期化や操作の煩雑化等の問題があった。このような集菌、溶菌および遺伝子の増幅等における問題は、結核菌を含む抗酸菌全体の問題でもあり、その他の菌およびウイルスにおいても起こり得る問題でもある。

【0 0 0 4】

【非特許文献 1】

新 結核菌検査指針 2 0 0 0、p.28-29、財団法人結核予防会発行

【0 0 0 5】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、特殊な装置を用いることなく簡単かつ短時間に微生物を収集できる方法の提供を第 1 の目的とし、特殊な装置や試薬を用いることなく簡単かつ短時間に微生物を検出できる遺伝子の特異的な増幅若しくは検出方法の提供を第 2 の目的とする。

【0 0 0 6】

【課題を解決するための手段】

前記第 1 の目的を達成するために、本発明の微生物の収集方法は、液状試料から微生物を収集する方法であって、前記液状試料を吸水性樹脂に接触させることにより、前記吸水性樹脂に前記液状試料の液相部を吸収させ、かつ前記吸水性樹脂表面部で微生物を捕獲して微生物を収集する方法である。

【0 0 0 7】

この方法によれば、前記吸水性樹脂により簡単かつ短時間に微生物を捕捉できるため、厳しい条件の遠心分離をする必要がない。

【0 0 0 8】

つぎに、前記第 2 の目的を達成するために、本発明の遺伝子の検出若しくは増幅方法は、微生物の遺伝子の特異的に増幅若しくは検出する方法であって、前記本発明の収集方法により微生物を収集し、これに非イオン性界面活性剤を含む抽出試薬液を添加して加熱することにより微生物から遺伝子を抽出し、この遺伝子

を特異的に増幅もしくは検出する方法である。

【0009】

この方法は、前記本発明の収集方法と組み合わせた方法であり、非イオン界面活性剤を含む抽出試薬液を添加して過熱するだけで遺伝子の抽出を行うことができ、その後の増幅等の操作に速やかに移ることができる。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明をさらに詳しく説明する。

【0011】

本発明の微生物の収集方法において、前記吸水性樹脂に前記液状試料を接触させた後、さらに、前記吸水性樹脂に回収液を接触させることにより、前記吸水性樹脂表面に捕獲された微生物を前記回収液中に回収することが好ましい。前記回収液は、特に制限されず、例えば、水、蒸留水、イオン交換水、超純水、緩衝液等が使用できるが、好ましくは、後述のように、微生物抽出液を回収液として使用することである。

【0012】

前記液状試料の添加量は、前記吸水性樹脂の吸水容量以下であることが好ましい。また、前記回収液の添加量は、前記液状試料液の液相部の吸収後における前記吸水性樹脂の吸水可能容量を超えた量であることが好ましい。前記吸水性樹脂は、例えば、自重の2～10000倍の吸水量、好ましくは、自重の5～5000倍の吸水量、より好ましくは、自重の10～1000倍の吸水量を、持つことが好ましい。前記吸水性樹脂は、特に制限されず、例えば、親水性官能基を有する親水性架橋重合体があげられる。前記親水性官能基としては、アニオン性、ノニオン性、カチオン性等の親水性官能基があげられ、例えば、カルボキシル基、スルフォニル基、アミノ基等があげられる。吸水性樹脂の具体例としては、例えば、カルボキシメチルセルロースの架橋物、澱粉－アクリルニトリルグラフト重合体の加水分解物、澱粉－アクリル酸グラフト重合体の中和物、ポリアクリル酸塩重合体の架橋物、ポリメタクリル酸塩重合体の架橋物、酢酸ビニル－アクリル酸エステル共重合体の鹸化物、アクリロニトリル重合体もしくはアクリルアミド

共重合体の加水分解物またはこれらの架橋物、スルホン基含有重合体の架橋物、ポリエチレンオキサイドもしくはポリエチレンイミンの架橋物等があげられる。これらは、単独で使用してもよく、2種類以上で併用してもよい。この中で、好ましいのは、ポリアクリル酸塩、ポリアクリル酸の部分中和物の架橋物であり、より好ましいのはポリアクリル酸塩であり、その具体例としては、ポリアクリル酸ナトリウムがある。吸水性樹脂の形態は、特に制限されないが、下記のように、粒子形状が好ましい。

【0013】

本発明の微生物の収集方法において、フィルターで内部が上下に分けられ、かつ前記フィルター上に吸水性樹脂粒子が配置されている遠心チューブを準備し、この遠心チューブに前記液状試料を入れて前記吸水性樹脂粒子に接触させ、ついで前記回収液を前記遠心チューブに入れて前記吸水性樹脂粒子に接触させ、遠心分離により前記回収液を、前記フィルターを通過させて前記遠心チューブの底部に移動させることが好ましい。

【0014】

前記方法に使用する遠心チューブは、フィルターで内部が上下に分けられ、かつ前記フィルター上に吸水性樹脂粒子が配置されている遠心チューブである。この一例を図1に示す。図示のように、この遠心チューブ1は、チューブ本体11と、キャップ12とを主要構成部材とする。チューブ本体11の外壁上部には、ネジ山16が形成され、キャップ12の内壁にはネジ溝17が形成され、これらにより、チューブ本体11とキャップ12とは螺合可能となっている。チューブ本体11の内部には、有底円筒状の支持体13が嵌め込まれており、前記支持体13の底にはフィルター14が配置され、この上に、吸水性樹脂粒子15が配置されている。前記フィルターは、特に制限されず、その孔径は、例えば、10 nm～100 μ mの範囲であり、好ましくは0.1～20 μ mの範囲であり、より好ましくは0.1～10 μ mの範囲である。前記フィルターの材質は、特に制限されず、例えば、ポリフッ化ビニリデン、ニトロセルロース、親水性ポリエーテルスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリスルホン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリマーアロイ、アセチルセルロ

ース等があり、このなかで、ポリフッ化ビニリデン、ポリカーボネートが好ましく、より好ましくはポリカーボネートである。

【0015】

この遠心チューブ1を使用した微生物の収集方法の一例を図2に示す。なお、図2において、図1と同一部分には同一符号を付している。すなわち、まず、図2(a)に示すように、チューブ本体11に、液状試料2を滴下する。すると、図2(b)に示すように、吸水性樹脂粒子15が前記液状試料2の液相部を吸水して膨張する。この時の液状試料2の滴下量は、吸水性樹脂粒子15全体の吸水量以下であり、微生物は、吸水性樹脂粒子15表面に付着している。そして、図2(b)に示すように、この吸水性樹脂粒子15に、さらに、回収液3を滴下する。上述のように、回収液として、抽出試薬液を使用することが好ましい。回収液3の滴下量は、前記液状試料2の液相部吸収後における吸水性樹脂粒子15全体の吸水可能容量を超えた量であるから、図2(c)に示すように、支持体13内部に、吸水されなかった回収液3が溜まり、ここに微生物が回収される。このとき、微生物の回収効率を向上させるために、回収液3中で吸水性樹脂粒子15を、ピペッティングを繰り返すこと等により、よく振とうさせることが好ましい。その後、キャップ12（図示せず）でチューブ本体11をキャップして、遠心分離する。本発明において、前記遠心分離の条件は、特に制限されず、例えば、500～13000Gで3秒～60分間、好ましくは1000～10000Gで10秒～10分間、より好ましくは5000Gで1分間である。遠心分離器も特に制限されず、例えば、卓上遠心分離器を使用してもよい。遠心分離後、図2(d)に示すように、遠心チューブの下部に回収液が溜まるので、これを回収して、後述の遺伝子検査の試料とする。

【0016】

つぎに、本発明の遺伝子の増幅若しくは検出方法において、前記抽出試薬液は、前記微生物の収集方法における回収液として使用することが好ましい。前記回収液が前記抽出試薬液であれば、これをそのまま加熱すれば遺伝子を抽出でき、前記抽出試薬液添加操作が省略できる。前記抽出試薬液の加熱温度は、特に制限されないが、70℃以上100℃未満が好ましい。加熱温度が、100℃未満で

あれば、突沸して試料が飛び散ることが無く、また温度コントロールが容易になって、特別の加熱器を必要としない等の利点がある。前記加熱温度は、より好ましくは80℃以上100℃未満であり、最適には96℃である。また、加熱時間は、例えば、1～30分であり、好ましくは10分間である。前記液体のpHは、例えば、pH7.0～12.0の範囲であり、好ましくはpH8.0である。前記抽出試薬液中の前記非イオン界面活性剤の濃度は、例えば、0.01～10重量%であり、好ましくは0.5～2.0重量%であり、より好ましくは1.0重量%である。

【0017】

前記非イオン界面活性剤としては、例えば、Span 20, Span 40, Span 60, Span 65, Span 80, Span 85等（以上、ナカライテスク社製等）のd-ソルビトールの脂肪酸エステル、Tween 20, Tween 21, Tween 40, Tween 60, Tween 65, Tween 80, Tween 81, Tween 85等（以上、ナカライテスク社製等）のポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル、Triton X-100等（以上、ナカライテスク社製等）のポリオキシエチレングリコールp-tert-オクチルフェニルエーテル等がある。これらは、単独で使用してもよいし、2種類以上で併用してもよい。このなかで、Triton X-100、Tween 20、Tween 21が好ましく、より好ましいのはTriton X-100である。

【0018】

本発明の遺伝子の増幅若しくは検出方法において、さらに、前記抽出試薬液は、金属キレート剤を含むことが好ましい。試料中には、DNase等の遺伝子分解酵素が含まれており、金属キレート剤は、これによる遺伝子の分解を防止する作用等を発揮する。前記抽出試薬液中の前記金属キレート剤の濃度は、例えば、0.1～100mMであり、好ましくは1.0mMである。前記金属キレート剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、エチレングリコールビス（ β -アミノエチルエーテル）-N, N, N', N'-四酢酸（EGTA）、ジアミノシクロヘキサン四酢酸、o-フェナンスロリン、サリチル酸等がある。これらは、単独で使用してもよいし、2種類以上で併用してもよい。このな

かで、好ましいのは、EDTA、EGTAであり、より好ましいのは、EDTAである。

【0019】

本発明の対象となる微生物は、特に制限されず、例えば、抗酸菌、非定型抗酸菌、淋菌、レジオネラ、マイコプラズマ、スピロヘータ、梅毒スピロヘーター、クラミジア、リケッチア、らい菌、鼠咬症スピリルム、ブドウ球菌、連鎖球菌、大腸菌、緑膿菌、ペスト菌、ウイルス、日本脳炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ATLV、HIVおよびエボラ出血熱ウイルス等がある。抗酸菌としては、例えば、鳥型結核菌 (M. avium)、エム・イントラセルラレエ (M. intracellularae)、エム・ゴルドネエ (M. gordonae)、ヒト型結核菌 (M. tuberculosis)、エム・カンサシイ (M. kansasii)、エム・フォルツイツム (M. fortuitum)、エム・ケロネエ (M. chelonae)、ウシ型結核菌 (M. bovis)、エム・スクロフラセウム (M. scrofulaceum)、パラ結核菌 (M. paratuberculosis)、チモテ菌 (M. phlei)、エム・マリヌム (M. marinum)、エム・シミエー (M. simiae)、エム・スクロフラセウム (M. scrofulaceum)、エム・スズルガイ (M. szulgai)、らい菌 (M. leprae)、エム・キセノピ (M. xenopi)、エム・ウルセランス (M. ulcerans)、鼠らい菌 (M. lepraemurium)、エム・フラベセンス (M. flavescens)、エム・テレエ (M. terrae)、エム・ノンクロモジェニクム (M. nonchromogenicum)、エム・マルメンス (M. malmoesense)、エム・アジアティクム (M. asiaticum)、エム・ヴァケエ (M. vaccae)、エム・ガストリ (M. gastri)、エム・トリビアル (M. triviale)、エム・ヘモフィラム (M. haemophilum)、エム・アフリカヌム (M. africanum)、エム・サーモレジスタブル (M. thermoresistabile) およびスメグマ菌 (M. smegmatis) 等がある。

【0020】

本発明において、前記液状試料としては、例えば、痰、髄液、糞、唾液、血液、組織、尿、これらの生体試料を前処理した試料等がある。前記前処理試料としては、例えば、喀痰をN-アセチル-L-システイン（NALC）と水酸化ナトリウム（NaOH）で処理した試料がある。

【0021】

つぎに、本発明の遺伝子の増幅若しくは検出方法は、例えば、以下のようにして実施できる。すなわち、まず、前記所定pHの緩衝液に、必要に応じてEDTA等の金属キレート剤を添加し、さらに非イオン界面活性剤を添加して抽出試薬液を調製する。前記緩衝液としては、Tris-HClバッファー、HEPESバッファー、MOPSバッファー、HEPPSバッファー、TAPSバッファー、リン酸バッファー等がある。この抽出試薬液は、オートクレイブにより高圧蒸気滅菌することが好ましい。他方、試料液を調製する。例えば、喀痰検体を、N-アセチル-L-システイン-NaOH法（NALC-NaOH法）等により、均質化および雑菌処理する。前記処理をした検体（液状試料）を、その内部に収集フィルターが配置され、この上に吸水性樹脂粒子が配置された遠心チューブ（例えば、図1に記載のもの）に添加し、さらに、前記抽出試薬液（回収液）を添加し、これを遠心分離（例えば、5000G、1分間）して、遠心チューブ下部に、前記抽出試薬液を溜める。この抽出試薬液を、そのまま、若しくは別のチューブに移して、ヒートブロック等を用い、前記所定の温度で加熱することにより、抽出処理を行う。なお、加熱方法としては、前記ヒートブロックの他に、例えば、ウォーターバス、マイクロウェーブオーブン、エアバス等がある。このようにして抽出処理した検体は、そのまま、若しくは前処理を施して遺伝子増幅若しくは検出処理を行うことができる。前記遺伝子増幅若しくは検出方法としては、例えば、PCR法、RT-PCR等のPCRの変法等がある。また、分析対象となる遺伝子としては、DNA、RNAがある。なお、回収液と抽出試薬液が別の場合は、回収液に抽出試薬液を加えて抽出処理をする。

【0022】

【実施例】

つぎに、本発明の実施例について説明する。

【 0 0 2 3 】

(実施例 1)

以下に示すようにして、培養結核菌株について、遺伝子検査を行った。

【 0 0 2 4 】

(結核菌の調製)

臨床分離結核菌株を商品名マイコプロス（極東製薬工業社製）にて、McFarland#1の濁度になるまで35℃で培養した。その後、0.067Mリン酸buffer(pH:6.8)にて10倍希釈系列（10⁰～10¹⁰倍希釈）を作成し、それを試料とした。

【 0 0 2 5 】

(集菌操作)

商品名アイソポアフィルター（孔径3μm，ミリポア社製）を備えたフィルターユニット（図1参照）に、吸水性樹脂粒子（商品名アクアキープ10SH P、住友精化社製）0.0065gを配置した遠心チューブ（図1参照）を準備した。この遠心チューブに、前記結核菌希釈試料100μLを添加し、その後、さらに抽出試薬液を500μL添加した。この抽出試薬液は、回収液を兼ねるものであり、TE緩衝液（10mMのEDTA、25mMのTris-HCl:pH8.0）に1%の濃度でTritonX-100（ナカライ）を溶解し、オートクレイブしたものである。その後、5000g、で1分間遠心分離し、遠心チューブ底に溜まったろ液（約100μL）を回収した。

【 0 0 2 6 】

(遺伝子抽出)

前記ろ液をヒートブロックにて96℃、10分間加熱し、結核菌を溶菌した。

【 0 0 2 7 】

(PCRによる遺伝子の検出)

前記溶菌液25μLに、商品名アンプリコア増幅キット（日本ロシュ社製）のMaster mixture 50μL及び15mM 酢酸マグネシウム 25μLを添加し、PCR反応を行った。反応条件および操作などは、前記キット添付文書どおりに行った。遺伝子の検出は、商品名アンプリコア検出キット（日本ロシュ社製）を用いて行った。この操作は前記キットの添付文書どおりに行った。

【 0 0 2 8 】

(比較例 1)

比較例として、前記試料を、商品名アンプリコア前処理キット（日本ロシュ社製）を用いて処理し、これについて、上記と同じPCRによる遺伝子の検出を行った。

【0029】

(結果)

実施例 1 および比較例 1 において、検出感度は双方ともに 10^5 倍希釈までPOSITIVEであり、それ以上はNEGATIVEであった。また、内部標準(IC)は双方ともすべてPOSITIVEであった。このことから、本発明の実施例と従来法である比較例とは、培養結核菌での集菌・溶菌効果は同等であるといえる。さらに、ICもすべて陽性であることから、PCR阻害物質の混入も抑えられたことがわかった。さらに、本発明の実施例は、比較例に比べ、集菌および溶菌に費やす時間が約5分の1に短縮された。

【0030】

(実施例 2)

結核(TB)の疑いのある患者からの喀痰検体(7検体)について、NALC-NaOH処理し、これを試料とした。この試料を用い、実施例 1 と同様にして、集菌、遺伝子の抽出、PCRによる遺伝子の検出を行った。この結果を、下記表 1 に示す。

【0031】

(比較例 2)

実施例 2 と同じ試料について、商品名アンプリコア前処理キット（日本ロシュ社製）を用いて処理し、これについて、実施例 1 と同じPCRによる遺伝子の検出を行った。この結果を下記の表 1 に示す。

【 0 0 3 2 】

(表 1)

サンプルNo.	実施例*	比較例*
1	1.786	2.796
2	2.809	2.662
3	2.875	2.85
4	2.668	2.8
5	2.772	2.816
6	2.752	2.741
7	2.728	2.736

* 吸光度 (波長 4 5 0 n m)

【 0 0 3 3 】

前記表 1 に示すように、7 検体全てにおいて、実施例 2 および比較例 2 とともに陽性となり、また内部標準 (I C) も、前記実施例 2 および比較例 2 において、陽性であった。このことから、本発明の方法は、従来の方法と同様の性能であるといえる。また、本発明の方法は、従来の方法にくらべ、集菌操作および溶菌操作を簡単かつ迅速に実施可能である。

【 0 0 3 4 】

【発明の効果】

以上のように、本発明の収集方法は、特殊な装置を用いることなく、簡単かつ短時間に微生物を収集できる方法である。したがって、本発明の方法を、遺伝子の増幅・検出法による微生物検査の試料の前処理に適用することにより、検査の高効率化を簡単に実現できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明の収集方法に使用する遠心チューブの構造の一例を示す断面図である。

【図 2】

図 2 の (a) ～ (d) は、本発明の収集方法の一例を示す工程図である。

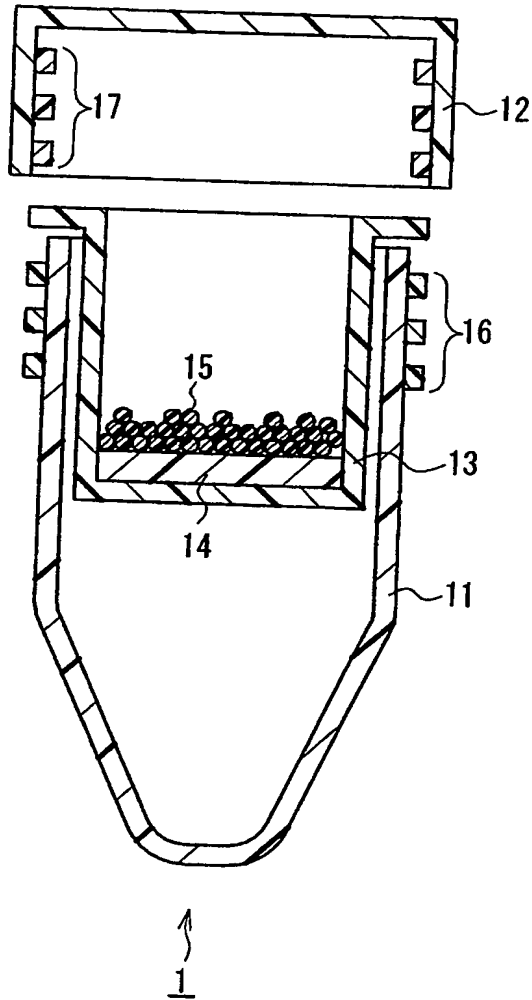
【符号の説明】

- 1 遠心チューブ
- 2 液状試料
- 3 回収液
- 11 チューブ本体
- 12 キャップ
- 13 支持体
- 14 フィルター
- 15 吸水性樹脂粒子
- 16 ネジ山
- 17 ネジ溝

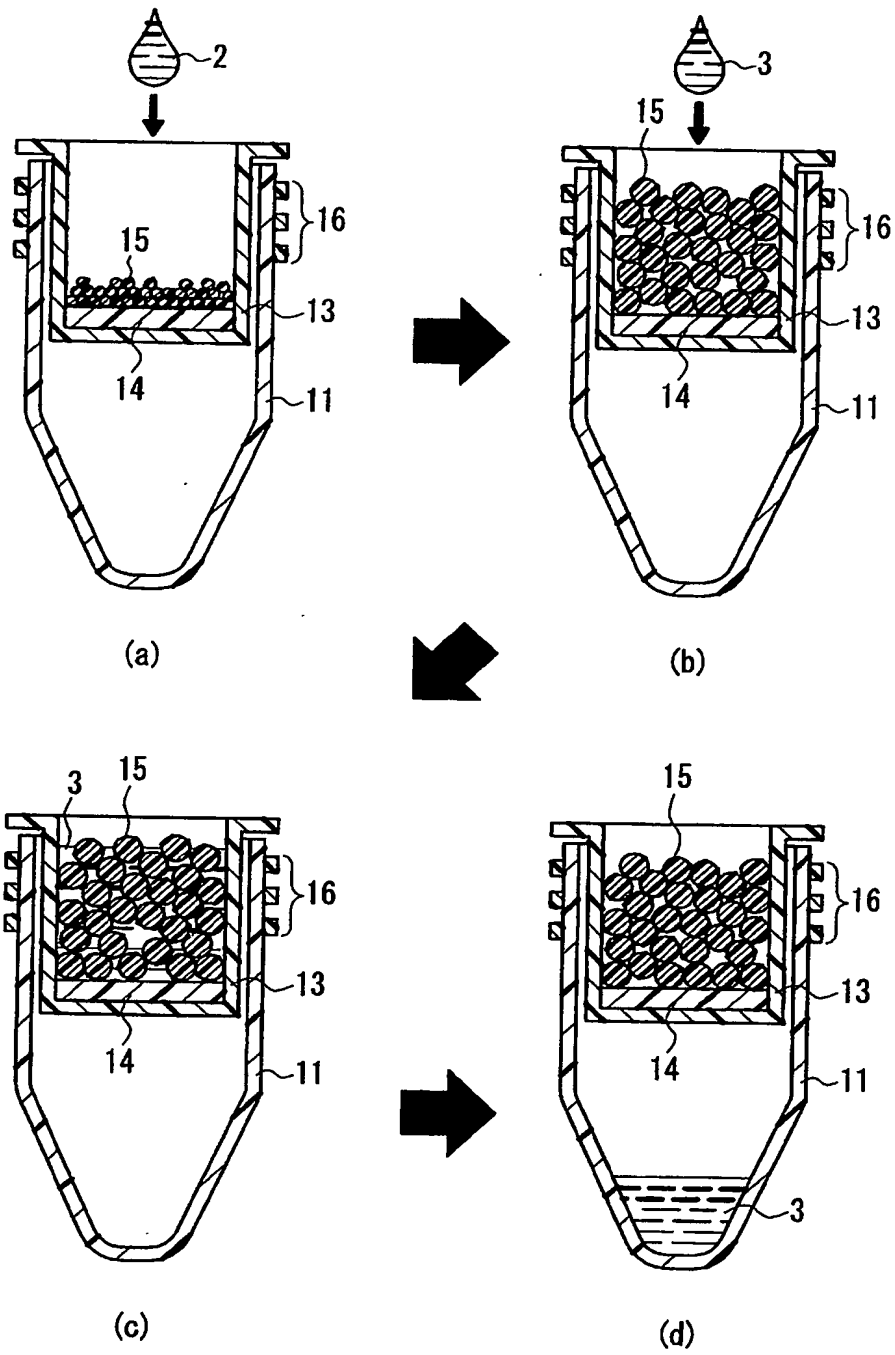
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 特殊な装置を用いることなく、簡単かつ短時間に微生物を収集できる方法を提供する。

【解決手段】 フィルター 14 で内部が上下に分けられ、かつ前記フィルター 14 上に吸水性樹脂粒子 15 が配置されている遠心チューブ 1 を準備し、この遠心チューブ 1 に液状試料を入れて前記吸水性樹脂粒子 15 に接触させることにより、液状試料を吸収させ、微生物を前記粒子表面で捕捉する。ついで前記回収液を前記遠心チューブ 1 に入れ、これで前記微生物を回収し、遠心分離により前記回収液を、前記フィルター 14 を通過させて前記遠心チューブ 1 の底部に溜める。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 2 - 3 6 5 8 1 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 4 1 8 9 7]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 6 月 1 2 日

[変更理由]

名称変更

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地

氏 名

アークレイ株式会社